

# Redox redulation of inhibitory Kappa B kinase

Citation for published version (APA):

Reynaert, N. L. (2006). *Redox redulation of inhibitory Kappa B kinase*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20061012nr>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2006

**DOI:**

[10.26481/dis.20061012nr](https://doi.org/10.26481/dis.20061012nr)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

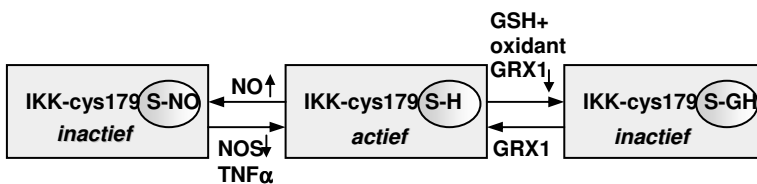
providing details and we will investigate your claim.

# HOOFDSTUK 11

## Samenvatting

De doelstelling in het eerste deel van dit proefschrift was om de modulatie van de activering van inhibitory kappa B kinase (IKK) en de transcriptie factor NF- $\kappa$ B door stikstofoxide en waterstofperoxide te onderzoeken.

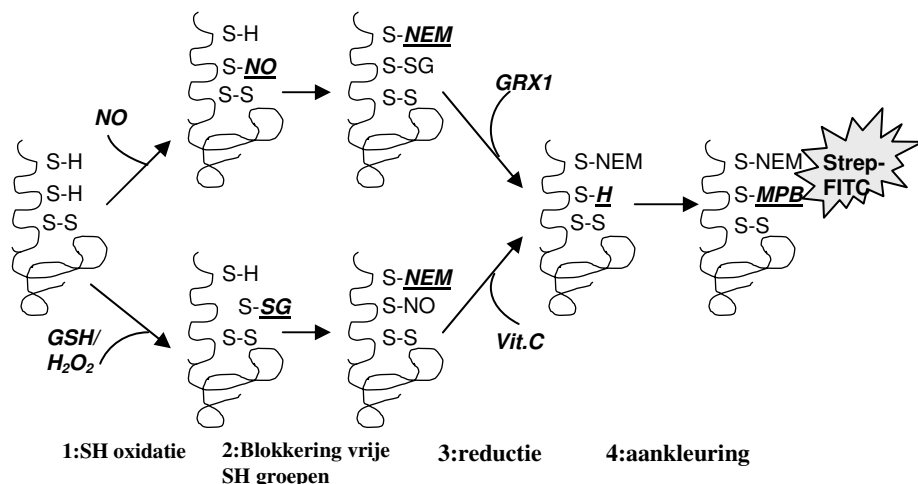
In het verleden werd al aangetoond dat stikstofoxide ontstekingsremmende eigenschappen vertoont. Ondermeer werd in studies aangetoond dat stikstofoxide zich kan binden aan een bepaald cysteine aminozuur in het p50 eiwit dat deel uitmaakt van NF- $\kappa$ B. Deze binding wordt ook S-nitrosylatie genoemd. Het heeft als resultaat dat NF- $\kappa$ B minder aan DNA kan binden en er bijgevolg minder ontstekingsgenen van DNA naar mRNA en eiwitten worden omgezet. In hoofdstuk 3 van dit proefschrift wordt de binding van stikstofoxide ook aangetoond in cysteine 179 van IKK, het eiwit dat de activering van NF- $\kappa$ B controleert. Dit heeft tot gevolg dat de activiteit van IKK wordt geremd en daardoor ook verminderde activering van NF- $\kappa$ B plaatsvindt. Voorts werd er door stikstofoxide producerende enzymen te blokkeren, aangetoond dat endogeen geproduceerd stikstofoxide de activiteit van IKK remt. Deze studie toont aan dat stikstofoxide een belangrijke rol speelt in de controle van IKK activatie (Figuur 1).



**Figuur 1** In dit proefschrift worden S-nitrosylatie en S-glutathionylatie beschreven als mechanismen waardoor oxidanten de activiteit van IKK kunnen remmen.

Omdat S-nitrosylatie een zeer onstabiele modificatie van eiwitten is, is het aantonen van S-nitrosylatie niet evident. Zo zijn er bijvoorbeeld geen goede antilichamen beschikbaar. De meest gebruikte methoden berusten daardoor op derivatisatie - technieken. In hoofdstuk 4 werd zo een derivatisatie- techniek aangepast om S-nitrosylatie van eiwitten visueel te

kunnen aantonen. Deze techniek wordt in het onderste deel van Figuur 2 schematisch weergegeven en berust op het blokkeren van vrije zwavel (S-) groepen in eiwitten en vervolgens de selectieve omzetting van S-nitrosylaties tot vrije S-groepen met behulp van vitamine C. De nieuw gevormde vrije S-groepen kunnen dan gemarkeerd worden met biotine en gevisualiseerd met fluorescent streptavidine. Deze nieuwe methode zal het mogelijk maken om S-nitrosylatie van eiwitten te lokaliseren in gezonde weefsels alsook om veranderingen te bestuderen in verscheidene ziekteprocessen.



**Figuur 2** In hoofdstukken 4 en 6 worden twee nieuwe methodes beschreven om respectievelijk S-nitrosylatie en S-glutathionylatie aan te kleuren in intacte cellen.

Waterstofperoxide is een oxidant dat net als stikstofoxide in beperkte mate voortdurend wordt aangemaakt door residentiële cellen. Onderzoek heeft aangetoond dat waterstofperoxide de activering van IKK door inflammatoire eiwitten kan beperken. In hoofdstuk 5 werd in dit proefschrift aangetoond dat waterstofperoxide de binding van glutathione aan cysteïne 179 in IKK induceert. Deze modificatie van eiwitten door glutathione wordt S-glutathionylatie genoemd en is verantwoordelijk voor de inhibitie van IKK door waterstofperoxide. Voorts werd aangetoond dat dit proces wordt gereguleerd door het antioxidant enzyme glutaredoxine 1. Overexpressie van glutaredoxine 1 beschermt IKK tegen inactivering door waterstofperoxide en verhoogt zelfs NF-κB activiteit. Aan de andere kant leidt verlaagde expressie van glutaredoxine 1 tot een verlaagde basale activiteit van IKK en NF-κB. Tevens zijn de activiteiten van zowel IKK

als NF- $\kappa$ B meer gevoelig voor inhibitie door waterstofperoxide als de expressie van glutaredoxine 1 is verlaagd. Deze studie toont aan dat de activiteit van IKK en NF- $\kappa$ B afhankelijk is van het antioxidant enzyme glutaredoxine 1 (Figuur 1).

S-glutathionylatie is een meer stabiele eiwit modificatie, maar toch zijn er net als voor S-nitrosylatie weinig methoden beschikbaar om dit te visualiseren. Naar analogie met de methode die werd ontwikkeld in hoofdstuk 4, wordt in het vijfde hoofdstuk een derivatisatie techniek geïntroduceerd om S-glutathionylatie aan te kleuren. Deze techniek wordt in het bovenste deel van Figuur 2 schematisch weergegeven en berust opnieuw op de blokkering van vrije S-groepen in eiwitten, maar maakt vervolgens gebruik van de catalytische deglutathionylatie activiteit van glutaredoxine om S-glutathionylatie specifiek om te zetten in vrije S-groepen. Net als in hoofdstuk 4 kunnen deze vrije S-groepen vervolgens worden gemarkeerd met biotine en gevisualiseerd met een fluorescent streptavidine. Aangezien het belang dat aan S-glutathionylatie wordt gehecht sterk is toegenomen in de afgelopen jaren, zal deze nieuwe methode zeer nuttig zijn voor het besturen en lokaliseren van deze eiwit modificatie in gezonde weefsels alsook in relatie tot verscheidene pathologiën.

Het tweede deel van dit proefschrift had tot doelstelling een rol aan te tonen voor endogeen waterstofperoxide in een muizenmodel voor astma en ook om de expressie van het antioxidant eiwit glutaredoxine in dit muizenmodel te onderzoeken.

De voorgaande studies toonden het potentiële belang aan van glutaredoxine gereguleerde S-glutathionylatie als een redox afhankelijke posttranslationale modificatie die inflammatie kan beïnvloeden. Daarom werd de expressie van de glutaredoxine enzymen in hoofdstuk 7 onderzocht in het muizenmodel voor astma. In deze studie werd aangetoond dat enkel de expressie van glutaredoxine 1, niet GRX2, is verhoogd in de longen gedurende allergische luchtwegontsteking in de muis. Dit leidt tot een verhoogde activiteit van GRX in de longen. Het cytokine interferon  $\gamma$  verhoogde de expressie van GRX1 en de GRX activiteit in een primaire kweek van luchtwegepitheelcellen, terwijl behandeling met het cytokine TGF $\beta$  de expressie van GRX1 en de GRX activiteit verlaagde. Deze studie toont aan dat GRX1 deel uitmaakt van de antioxidant respons tijdens allergische luchtwegontsteking en dat

bijgevolg veranderde S-glutathionylatie een rol zou kunnen spelen in het ziekteproces.

Studies in muizen waarbij supplementatie met antioxidanten werd getest wijzen erop dat waterstofperoxide een etiologische rol zou kunnen spelen in het ontstaan van allergische luchtwegontsteking. Om dit verband direct aan te tonen werd in hoofdstuk 8 onderzocht of muizen die het waterstofperoxide detoxifiërend enzyme catalase tot overexpressie brengen (catalase transgene muizen), beschermd zijn tegen het ontwikkelen van allergische luchtwegontsteking. Ten eerste werd gevonden dat deze muizen in staat zijn om een normale immuunrespons tegen het ovalbumine allergeen te genereren. Voorts bleek dat catalase transgene muizen niet beschermd zijn tegen inflammatie. Integendeel zelfs, deze muizen vertoonden tekenen van verhoogde slijm (mucus) productie. Ook onverwachts vertoonden deze muizen een verhoogde reactiviteit van de luchtwegen na het toedienen van metacholine. Deze verhoogde reactiviteit werd waargenomen in controle muizen alsook in muizen met allergische luchtwegontsteking. Uit deze studie kan de conclusie getrokken worden dat overexpressie van catalase niet leidt tot bescherming tegen allergische luchtwegontsteking, maar integendeel verhoogde slijmproductie en overgevoeligheid van de longen veroorzaakt.

In dit proefschrift wordt aangetoond dat zowel stikstof- als waterstofperoxide een belangrijke controle uitoefenen over de activering van IKK en NF- $\kappa$ B. Deze oxidanten kunnen bijgevolg een belangrijke rol vervullen in de modulatie van ontstekingsprocessen.